2 月 February
2019, 62(2): 150 - 159
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.02.002

中红侧沟茧蜂气味结合蛋白 MmedOBP18 的原核表达及配体结合特性

宋 玄[1,2], 单 双[2,3], 王山宁[4], 陶宇逍[1,2], 李瑞军[1,*], 张永军[2,*]

(1. 河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071000; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193; 4. 北京农林科学院植保护环境保护研究所, 北京 100097)

摘要:【目的】研究中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 气味结合蛋白 MmedOBP18 在触角中的表达定位,解析 MmedOBP18 重组蛋白的配体结合特性。【方法】原核表达中红侧沟茧蜂气味结合蛋白 MmedOBP18;采用荧光免疫组织化学技术研究 MmedOBP18 在中红侧沟茧蜂雌蜂触角中的表达定位;通过荧光竞争结合实验分析 MmedOBP18 重组蛋白与 99 种候选配体的结合特性。【结果】在原核表达系统中成功表达 MmedOBP18 重组蛋白。荧光免疫定位结果显示 MmedOBP18 主要表达在触角锥形感器 I 内的淋巴液中。荧光竞争结合实验结果表明,MmedOBP18 重组蛋白能够与 16 种候选配体结合,与低挥发性植物挥发物 2-十三酮、十二醛、十四酸和十一酸的结合能力最强,其解离常数 K_i 值分别为 5.21, 6.42, 6.49 和 6.58 μmol/L;而且 MmedOBP18 重组蛋白与非挥发性植物次生物质棕榈酸、棉酚、槲皮素及亚麻酸也有较强的结合能力,K_i 值分别为 3.86, 5.07, 5.08 和 6.51 μmol/L;此外,MmedOBP18 重组蛋白与鳞翅目昆虫性信息素组分顺-9-十四碳烯醛及顺-11-十六碳醛表现出较强的结合能力,K_i 值分别为 9.09 和 11.67 μmol/L,提示该蛋白在寄主定位过程中可发挥重要的作用。【结论】中红侧沟茧蜂气味结合蛋白 MmedOBP18 能够结合长链低挥发和非挥发性化合物,推测其在嗅觉和味觉识别中发挥双重功能,主要参与对寄主和寄主生境的化学信息的近距离识别。

关键词: 中红侧沟茧蜂; 气味结合蛋白; MmedOBP18; 荧光免疫定位; 配体结合特性; 化学感受

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)02-0150-10

Prokaryotic expression and ligand binding characteristics of odorant binding protein MmedOBP18 of the parasitoid wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae)

SONG Xuan[1,2], SHAN Shuang[2,3], WANG Shan-Ning[4], TAO Yu-Xiao[1,2], LI Rui-Jun[1,*], ZHANG Yong-Jun[2,*] (1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 4. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract:【Aim】To clarify the expression of the odorant binding protein MmedOBP18 in the antenna of *Microplitis mediator*, and to investigate the ligand binding characteristics of the recombinant MmedOBP18.【Methods】The recombinant MmedOBP18 of *M. mediator* was expressed in the prokaryotic

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672038, 31621064)
作者简介: 宋玄, 男, 1992 年 5 月生, 河北张家口人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫化学生态学, E-mail: songxuansongxuan@163.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: liruijun99@sina.com; yjzhang@ippcaas.cn
收稿日期 Received: 2018-07-25; 接受日期 Accepted: 2018-11-05

expression system. The localization of expression of MmedOBP18 in the antenna of female wasps of *M. mediator* was evaluated using fluorescence immunohistochemistry assay. The binding characteristics of the recombinant MmedOBP18 protein to 99 candidate ligands were analyzed by fluorescence competitive binding assay. 【Results】The recombinant MmedOBP18 protein was successfully expressed in the prokaryotic expression system. The immunofluorescence localization result showed that MmedOBP18 was mainly expressed in the lymph of sensilla basiconica type I of the antenna. The recombinant MmedOBP18 could strongly bind with 16 kinds of ligands. Among the low volatile compounds, 2-tridecanone, dodecyl aldehyde, myristic acid and undecylic acid showed the strongest binding capacities to the recombinant MmedOBP18, with the dissociation constant (K_i) values of 5.21, 6.42, 6.49 and 6.58 μmol/L, respectively. The non-volatile compounds palmitic acid, gossypol, quercetin and linolenic acid also showed strong binding capabilities to the recombinant MmedOBP18, with the K_i values of 3.86, 5.07, 5.08 and 6.51 μmol/L, respectively. In addition, the lepidopteran pheromone components (*Z*)-9-tetradecenal and (*Z*)-11-hexadecenal also showed strong binding capabilities to MmedOBP18, with the K_i values of 9.09 and 11.67 μmol/L, respectively, suggesting an important role of MmedOBP18 in host localization. 【Conclusion】The MmedOBP18 of *M. mediator* has strong binding capabilities to long-chain low volatile or non-volatile compounds. We speculated that MmedOBP18 may play a dual role in olfactory and taste recognition, and is mainly involved in the close range perception of chemical signals from host and host habitats.

Key words: *Microplitis mediator*; odorant binding protein; MmedOBP18; immunofluorescence localization; ligand binding characteristics; chemoreception

昆虫依靠灵敏的嗅觉系统感知识别外界化学信号,包括气味受体(odorant receptors, ORs)、离子型受体(ionotropic receptors, IRs)和气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)等众多的嗅觉相关蛋白参与了这个化学感受过程(Leal, 2013)。昆虫OBPs是存在于昆虫触角感器淋巴液中的一类水溶性球状蛋白,分子量约13~17 kD,含有6个保守的半胱氨酸残基(Cys),3个二硫键分别为CysⅠ-Ⅱ,CysⅡ-Ⅴ和CysⅣ-Ⅵ,其作用为支撑和稳定蛋白质结构(Pelosi and Maida, 1995; Pelosi, 1999)。昆虫OBPs按照功能可分为触角结合蛋白(antennal binding protein X, ABPX)、普通气味结合蛋白(general odorant binding proteins, GOBPs)和性信息素气味结合蛋白(pheromone-binding proteins, PBPs)(Vogt *et al*., 1991; Krieger *et al*., 1996; Robertson *et al*., 1999)。第一个PBP蛋白是从多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 雄性触角中发现的(Vogt and Riddiford, 1981; Robertson *et al*., 1999),随后大量的气味结合蛋白在鳞翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目等昆虫类群中被鉴定。例如,在美洲大蠊 *Periplaneta americana* 中鉴定到3个OBP基因(*PameOBP*1-3)(Li *et al*., 2017),在麦蛾 *Sitotroga cerealella* 中鉴定出 *ScerGOBP*1 和 *ScerGOBP*2(Ma *et al*., 2016)。在红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 触角中发现了11个OBP基因(*RferOBP*1-11),且它们在雌雄触角间的表达差异显著(Yan *et al*., 2016)。中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis* 体内鉴定到16个OBP基因,其中4个基因(*AsutOBP*1, 4, 5和9)在雄性触角中的表达量显著高于雌性(Cui *et al*., 2016)。气味结合蛋白在昆虫化学信息识别前期过程中发挥重要作用,例如:桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的BdorOBP1a和BdorOBP2能够识别植物花香气味β-紫罗兰酮(陈玲等, 2013; 吴健等, 2018);梨小食心虫 *Grapholita molesta* 的GmolOBP3可与其性信息素类似物顺-8-十二碳烯醋酸酯和顺-8-十二碳烯醇结合(宋月芹等, 2014);中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的普通气味结合蛋白AcerASP2与4-烯丙基藜芦醚结合能力最强(李红亮等, 2013)。昆虫气味结合蛋白除了参与嗅觉识别外,还在味觉感受行为中发挥功能,例如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的OBP28a和OBP56h具有苦味识别功能,可识别奎宁、罂粟碱等(Swarup *et al*., 2014)。

中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 隶属膜翅目(Hymenoptera)茧蜂科(Braconidae),是一种广谱性的夜蛾科幼虫内寄生蜂,对棉铃虫 *Helicoverpa*

armigera 和粘虫 *Mythimna separata* 等夜蛾科幼虫有非常好的生物防治效果(许维岸和何俊华, 2006; 潘洪生等, 2011)。本实验室前期构建的中红侧沟茧蜂触角转录组数据中共计鉴定出 20 个气味结合蛋白基因(*MmedOBP*1 - 20)序列。组织表达谱结果表明气味结合蛋白基因 *MmedOBP*18 主要在雌性中红侧沟茧蜂触角中高表达,原位杂交结果显示 *MmedOBP*18 主要定位在触角锥形感器Ⅰ中,推测其在寄生蜂化学感受中发挥重要功能(Peng *et al*., 2017; Wang *et al*., 2018)。有鉴于此,本研究重组表达了 MmedOBP18 蛋白,采用荧光免疫组织化学技术从蛋白水平进一步对 MmedOBP18 在触角感器中进行定位,通过荧光竞争结合实验研究了 MmedOBP18 重组蛋白的配体结合特性,以期为阐明寄生蜂化学感知行为提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

中红侧沟茧蜂非滞育茧由河北省农林科学院植物保护研究所提供,将蜂茧放置在相对湿度 60% ± 5%,温度 28 ± 1℃,光周期 14L∶10D 的人工气候箱中,待寄生蜂羽化后喂食 10% 蜂蜜水备用。

1.2 主要试剂

EasySee Western Blot Kit、胶回收和质粒提取试剂盒和克隆感受态细胞 Trans-T1 购自全式金生物技术有限公司;克隆载体 Blunt、表达载体 pET30a(+)以及高保真聚合酶 KOD MasterMix 购自中美泰和生物技术公司;限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ购自 TaKaRa 生物公司; T4 连接酶购自 Thermo Scientific 公司;表达感受态细胞 BL21(DE3)购自博迈德生物公司;柱填料以及测定蛋白浓度试剂购自康为世纪生物科技有限公司;重组肠激酶 Ecombinant Entherokinase 购自 Novagen 公司;荧光探针 1-NPN 和气味标样分别购自美国 Sigma 公司、日本东京化成工业株式会社(TCI)、常州宁录生物有限公司及北京百灵威科技有限公司;华大基因公司提供抗体制备服务。

1.3 MmedOBP18 重组表达

中红侧沟茧蜂 *MmedOBP*18 基因(GenBank 登录号: KU342581)序列全长从本实验室前期中红侧沟茧蜂触角转录组数据中获得(Peng *et al*., 2017)。使用 TRlzol Reagent 试剂盒(Ambion)提取雌性触角总 RNA, 利用 FastQuant RT Kit(天根)合成 cDNA 模板。根据切除信号肽的基因序列采用 Beacon Designer 7.9(PREMIER Biosoft International)设计引物,正向引物 OBP18-F: 5′-GGATCCGAATCAAGTGGAGAAA-3′;反向引物 OBP18-R: 5′-CTCGAGTTATTCATTATGCTTTTT-3′;下划线部分分别为 *BamH*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ的酶切位点。PCR 反应体系(50 μL):雌性触角 cDNA 模板 1 μL, 2 × KOD MasterMix 25 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH_2O 22 μL。扩增程序: 94℃预变性 2 min; 98℃变性 10 s, 50℃退火 30 s, 68℃延伸 1 min, 35 个循环;最后 68℃延伸 7 min。参照试剂盒说明书对目的片段进行酶切,目的片段用 T4 连接酶连接至表达载体 pET30a(+)。测序正确后,参照 BL21(DE3)表达感受态大肠杆菌 *Escherichia coli* 说明书,将单克隆菌株在含有 100 mg/mL 卡那霉素(Kan)的培养基中 37℃培养。待 OD 值为 0.6 ~ 0.8 时培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,在 18℃下进行诱导表达 16 h。超声破碎后,收集上清液。将上清溶液通过亲和层析镍柱纯化,纯化蛋白用重组肠激酶 30℃孵育 12 h。再次用亲和层析镍柱纯化,经超滤浓缩后得到无 His 标签 MmedOBP18 重组蛋白。通过 15% SDS-PAGE 电泳检测各阶段目的蛋白的表达情况。纯化的无 His 标签 MmedOBP18 重组蛋白送华大基因公司制备多克隆抗体。

1.4 Western blot 检测

选取羽化 2 d 的中红侧沟茧蜂雌蜂触角 10 对,参照 TRlzol Reagent 试剂盒说明书提取触角粗蛋白。具体步骤如下:在 1.5 mL 离心管中加入 1 mL TRlzol Reagent 碾磨雌蜂触角样品,室温静置 5 min;加氯仿 200 μL 混匀, 11 4 00 g 4℃离心 15 min,保留下层;加 0.3 mL 无水乙醇混匀;室温孵育 3 min; 950 g 4℃离心 15 min,留上层溶液;取 500 μL 溶液加 750 μL 异丙醇混匀,室温孵育 10 min; 11 400 g 4℃离心 15 min,弃上清;使用 95 % 乙醇溶解的 0.3 mol/L 盐酸胍 Washing Solution 洗沉淀 3 ~ 4 次, 7 100 g离心 5 min,室温静置 20 min;弃上清,加 100% 乙醇 1 mL 振荡 2 min;室温静置 20 min, 7 100 g 4℃低温离心 10 min;弃上清,室温干燥 5 ~ 10 min;加 1% 的十二烷基硫酸钠溶液 50 μL; 950 g 4℃低温离心 10 min,上清液即是触角粗蛋白液, -40℃保存备用。MmedOBP18 重组蛋白和触角粗蛋白通过 15% SDS-PAGE 电泳分离。参照 EasySee Western Blot Kit 说明书进行 Western blot 操作,配制 Oxidant∶Luminol∶Light intensifier 为800∶800∶1(v/v)

的曝光液，使用化学发光成像分析仪（LAS-4000 mini，日本）检测抗体的特异性。

1.5　荧光免疫组织化学检测

将刚羽化 3 d 的中红侧沟茧蜂雌蜂触角置于 4% 多聚甲醛（pH 7.4）溶液中，4℃ 下孵育 40 min，后转入含有 25% 的蔗糖的 PBST 溶液（0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液），4℃ 过夜。次日将处理好的触角用包埋剂包埋，用冷冻切片机切片，厚度为 12 μm，－40℃ 保存。检测时切片室温干燥 30～60 min，多聚甲醛（PFA）固定液 4℃ 固定样片；固定好的样片用 PBST 洗 3 次，每次 5 min。参照试剂盒 ImageiT FX Signal Enhancer 说明书，孵育样片；PBST 清洗样品后，使用 5% 的 NGST 溶液，封闭盖玻片 1 h。随后，用 PBST 清洗样品 3 次，每次 5 min。用 NGST 溶液以 1∶2 000 比例稀释抗体 anti-MmedOBP18，100 μL/片，室温孵育 2 h。PBST 清洗样品 3 次，每次 5 min。最后，用封片剂（10% Mowiol 4-88，20% 甘油溶于 PBS 溶液）封片，通过激光共聚焦显微镜（Zeiss，德国）在 ALEXA 488 nm 波长下观察。

1.6　荧光竞争结合实验

以 99 种化合物为候选配体，包括 83 种植物挥发物，5 种鳞翅目昆虫性信息素组分以及 11 种非挥发性植物次生物质（张康等，2011；魏宇，2016；杨叶青等，2017）（表 1），在 F-380 荧光分光光度计（天津）上进行荧光竞争结合实验，扫描发射波长范围 370～550 nm，激发波长 337 nm。使用色谱级甲醇溶解荧光探针 1-NPN，母液使用浓度为 1 mmol/L。在测定 MmedOBP18 与探针的结合能力曲线时，比色杯中加入溶解在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中的重组蛋白 MmedOBP18 溶液，终浓度为 2 μmol/L，在 337 nm 的激发波下，加入探针的浓度从 2 μmol/L 梯度递增至 12 μmol/L，记录与蛋白的结合值，重复 3 次。筛选配体时，加入配体的浓度从 2 μmol/L 梯度递增至 30 μmol/L，通过 Scatchard 方程计算竞争解离常数 K_i（$K_i = [IC_{50}]/(1 + [1\text{-NPN}]/K_{1\text{-NPN}})$）。$IC_{50}$ 是配体置换 50% 探针 1-NPN 时的浓度，[1-NPN] 是未结合的 1-NPN 的浓度，$K_{1\text{-NPN}}$ 为 MmedOBP18 与 1-NPN 的解离常数（Gu *et al.*，2011）。

2　结果

2.1　气味结合蛋白 MmedOBP18 的重组表达

MmedOBP18 重组蛋白主要在上清液中高表达（图 1）。重组肠激酶切除 His 标签后，获得分子量约为 15 kD 目的蛋白，超滤后得到浓度为 1 mg/mL 纯化蛋白。

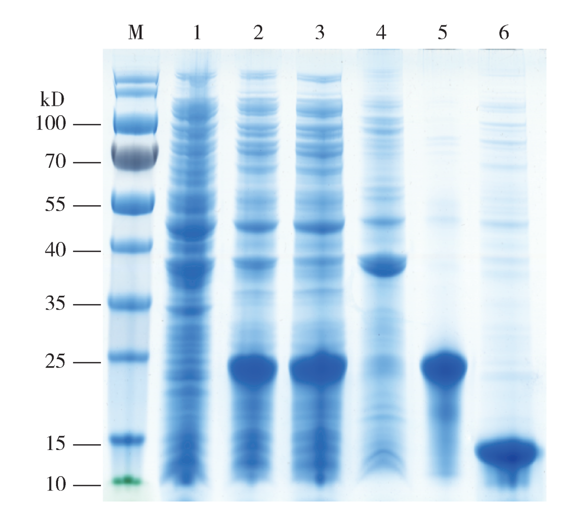


图 1　中红侧沟茧蜂 MmedOBP18 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 1　SDS-PAGE analysis of the recombinant MmedOBP18 of *Microplitis mediator*

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：未诱导的大肠杆菌菌体 Non-induced *Escherichia coli*；2：诱导的大肠杆菌菌体 Induced *E. coli*；3：上清液 Supernatant；4：包涵体蛋白 Inclusion body protein；5：带 His 标签 MmedOBP18 蛋白 Recombinant MmedOBP18 with His-tag；6：无 His 标签 MmedOBP18 蛋白 Recombinant MmedOBP18 without His-tag.

2.2　Western blot 检测

MmedOBP18 重组蛋白和触角粗蛋白分别能够与 anti-MmedOBP18 抗体特异性结合（图 2），均出现一条特异性电泳条带，表明 anti-MmedOBP18 抗体的特异性能够满足后续的免疫组织化学检测。

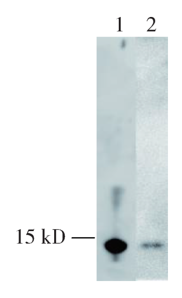


图 2　MmedOBP18 蛋白 Western blot 检测

Fig. 2　Western blot analysis of MmedOBP18

1：MmedOBP18 重组蛋白 Recombinant MmedOBP18；2：提取自中红侧沟茧蜂雌蜂的触角粗蛋白 Crude protein extracted from antennae of female wasps of *Microplitis mediator*.

2.3　气味结合蛋白 MmedOBP18 在触角中的表达定位

荧光免疫组化表明，MmedOBP18 主要表达在触

角锥形感器 I 下方淋巴液中，在触角刺形感器、毛形感器及腔锥形感器中均未检测到绿色荧光信号(图 3)。一般来说，中红侧沟茧蜂锥形感器 I 参与味觉识别过程，推测 MmedOBP18 可能在中红侧沟茧蜂的味觉识别行为中发挥作用。

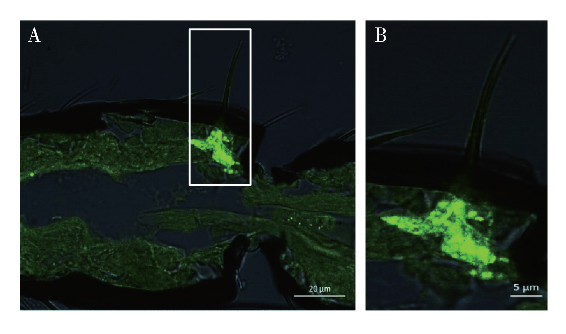


图 3 MmedOBP18 在中红侧沟茧蜂触角的免疫荧光定位
Fig. 3 Immunofluorescence localization of MmedOBP18 in the antenna of *Microplitis mediator*
A: MmedOBP18 在雌蜂触角中的表达定位，方框中显示 MmedOBP18 大量分布在锥形感器 I 中 Localization of expression of MmedOBP18 in the antenna of female wasp, the box showing that MmedOBP18 is mainly distributed in the sensilla basiconica type I. B: 图 A 方框的放大 Magnification of the box in Fig. A.

2.4 荧光竞争结合实验分析 MmedOBP18 重组蛋白与配体的结合

1-NPN 与 MmedOBP18 重组蛋白的解离常数为 1.92 μmol/L(图 4)。荧光竞争结合实验结果表明，MmedOBP18 重组蛋白与鳞翅目昆虫性信息素组分顺-9-十四碳烯醛和顺-11-十六碳醛有较强的结合能力，解离常数 K_i 分别为 9.09 和 11.67 μmol/L，提示该蛋白可参与寄主昆虫的识别定位。在 83 种植物挥发物中，MmedOBP18 可与 10 种低挥发性植物挥发物结合，其中以 2-十三酮、十二醛、十四酸和十一酸的结合能力最强，其解离常数 K_i 分别为 5.21, 6.42, 6.49 和 6.58 μmol/L；与 2-十一酮、癸醇、十三酸、辛烷、癸醛及十二酸表现中等的结合力，K_i 分别为 10.36, 11.63, 11.68, 14.37, 15.73 和 17.69 μmol/L；此外，MmedOBP18 重组蛋白与半挥发或不挥发性物质棕榈酸、棉酚、槲皮素和亚麻酸的结合能力也比较强，K_i 分别为 3.86, 5.07, 5.08 和 6.51 μmol/L；其余未结合的候选化合物解离常数均大于 50 μmol/L (表 1)。

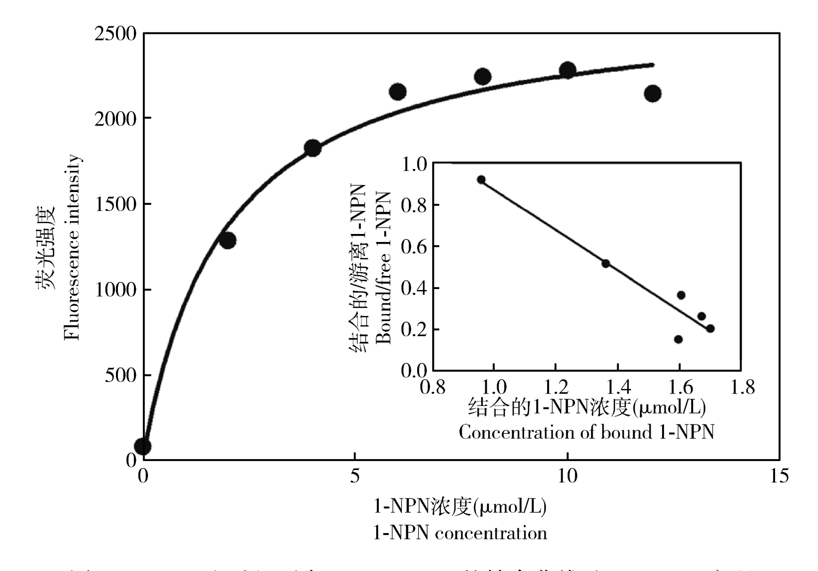


图 4 1-NPN 和重组蛋白 MmedOBP18 的结合曲线及 Scatchard 方程
Fig. 4 The binding curve and Scatchard plot of 1-NPN to the recombinant MmedOBP18

表 1 重组 MmedOBP18 蛋白与候选配体结合能力
Table 1 Binding capabilities of the recombinant MmedOBP18 to candidate ligands

配体标样 Ligand samples	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.	纯度(%) Purity	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
醛类 Aldehydes					
辛醛 Octanal	Sigma	124-13-0	99	–	–
十二醛 Dodecyl aldehyde	Sigma	112-54-9	99	10.03 ±0.05	6.42
庚醛 Heptanal	TCI	111-71-7	>95	–	–
香茅醛(±)-Citronellal	Sigma	106-23-0	≥95	–	–

续表 1 Table 1 continued

配体标样 Ligand samples	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.	纯度(%) Purity	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
丁醛 Butyraldehyde	Sigma	123-72-8	≥99.5	–	–
癸醛 Decanal	TCI	112-31-2	>95	24.05±0.08	15.73
壬醛 Nonanal	TCI	124-19-6	>95	–	–
苯甲醛 Benzaldehyde	Sigma	100-52-7	98	–	–
萜烯类 Terpenes					
(+/-)-柠檬烯(*R*)-(+)-Limonene	Sigma	5989-27-5	98	–	–
左旋-beta-蒎烯(1*S*)-(1)-Beta-Pinene	北京百灵威科技有限公司	18172-67-3	98	–	–
萜品油烯 Terpinolene	Sigma	586-62-9	≥90	–	–
β-蒎烯 β-Pinene	TCI	127-91-3	98	–	–
莰烯 Camphene	TCI	79-92-5	80	–	–
月桂烯 Myrcene	TCI	123-35-3	75	–	–
氧化石竹烯(-)-Caryophyllene	Sigma	1139-30-6	95	–	–
葎草烯 α-Humulene	北京百灵威科技有限公司	6753-98-6	98	–	–
酸类 Acids					
庚酸 Heptanoic acid	TCI	111-14-8	98	–	–
壬酸 Nonanoic acid	TCI	112-05-0	98	–	–
油酸 Octadecenoic acid	TCI	112-80-1	85	–	–
2-氧代戊酸 2-Oxyvalyl acid	TCI	1821-02-9	>95	–	–
丙酮酸 Pyruvic acid	TCI	127-17-3	>95	–	–
癸酸 Decanoic acid	TCI	334-48-5	>98	–	–
丙烯酸 Acrylic acid	TCI	79-10-7	>99	–	–
辛酸 Octanoic acid	TCI	124-07-2	>98	–	–
甲酸 Formic acid	TCI	64-18-6	98	–	–
十一酸 Undecylic acid	Sigma	112-37-8	≥99	9.97±0.03	6.58
十二酸 Lauric acid	北京百灵威科技有限公司	143-07-7	≥99.5	28.08±0.08	17.69
十三酸 Tridecanoic acid	Sigma	638-53-9	>98	17.95±0.13	11.68
十四酸 Myristic acid	Sigma	544-63-8	≥99.5	10.04±0.04	6.49
烷类 Alkanes					
1,2-二氨基-2-甲基丙烷 1,2-Diamino-2-methylpropane	TCI	811-93-8	99	–	–
十三烷 Tridecane	Sigma	629-50-5	99	–	–
癸烷 Decane	TCI	124-18-5	>99	–	–
十一烷 Undecane	TCI	1120-21-4	>99	–	–
十六烷 Hexadecane	TCI	629-73-2	>98	–	–
十四烷 Tetradecane	TCI	629-59-4	>99	–	–
异癸烷 2-Methylnonane	Sigma	871-83-0	98	–	–
辛烷 Octane	Sigma	111-65-9	>99	22.07±0.07	14.37
十五烷 Pentadecane	TCI	629-62-9	>98	–	–
十七烷 Heptadecane	Sigma	629-78-7	99	–	–
十二烷 Dodecane	TCI	112-40-3	>99	–	–
二十三烷 Tricosane	TCI	638-67-5	>98	–	–
吡咯烷 Pyrrolidine	Sigma	123-75-1	99	–	–
酮类 Ketones					
2-癸酮 2-Decanone	Sigma	693-54-9	98	–	–
2-庚酮 2-Heptanone	TCI	110-43-0	98	–	–
2-辛酮 2-Octanone	Sigma	111-13-7	98	–	–

续表 1 Table 1 continued

配体标样 Ligand samples	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.	纯度(%) Purity	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
beta-紫罗兰酮 beta-Ionone	北京百灵威科技有限公司	14901-07-6	96	–	–
2-十一酮 2-Undecanone	TCI	112-12-9	>98	15.93 ±0.06	10.36
2-十五烷酮 2-Pentadecanone	Sigma	2345-28-0	98	–	–
2-十三烷酮 2-Tridecanone	Sigma	593-08-8	98	8.03 ±0.03	5.21
醇类 Alcohols					
2-氨基乙醇 Ethanolamine	Sigma	141-43-5	98	–	–
3-己醇 3-Hexanol	TCI	623-37-0	>98	–	–
顺-3-己烯-1-醇 *cis*-3-Hexen-1-ol	Sigma	928-96-1	98	–	–
香茅醇 Citronellol	TCI	106-22-9	92	–	–
异樟醇 DL-Isoborneol	Sigma	124-76-5	95	–	–
丙醇 1-Propanol	TCI	71-23-8	>99.5	–	–
癸醇 1-Decanol	Sigma	112-30-1	99	17.88 ±0.12	11.63
D-香茅醇(*R*)-(+)-β-Citronellol	Sigma	1117-61-9	92	–	–
2-己醇 2-Hexanol	TCI	626-93-7	>98	–	–
1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	Sigma	3391-86-4	99	–	–
1-己醇 Hexyl alcohol	Sigma	111-27-3	99	–	–
正壬醇 1-Nonanol	Sigma	143-08-8	98	–	–
松油醇 Terpineol	Sigma	8000-41-7	90	–	–
苯环、杂环、胺类 Benzene ring, heterocycle and amines					
间二甲苯 M-xylene	TCI	108-38-3	>99	–	–
乙酰苯 Acetophenone	TCI	98-86-2	>98.5	–	–
香芹酚 Carvacrol	TCI	499-75-2	>90	–	–
吲哚 Indole	Sigma	120-72-9	>98	–	–
丁腈 Butyronitrile	北京百灵威科技有限公司	109-74-0	>99	–	–
1-甲基哌啶 1-Methylpiperidine	TCI	626-67-5	>95	–	–
2-戊基吡啶 2-Pentyl Pyridine	TCI	2294-76-0	>95	–	–
乙胺 Ethylamine	TCI	75-04-7	>95	–	–
叔丁基二甲胺 2-Propanamine, N, N, 2-trimethyl-	TCI	918-02-5	>98	–	–
辛二胺 1,8-Diaminooctane	TCI	373-44-4	>96	–	–
酯类 Esters					
丁酸辛酯 n-Octyl butyrate	Sigma	110-39-4	97	–	–
乙酸辛酯 n-Octyl acetate	TCI	112-14-1	>98	–	–
己酸己酯 Hexyl hexanoate	TCI	6378-65-0	>96	–	–
月桂酸乙酯 Ethyl laurate	Sigma	106-33-2	>98	–	–
丁酸叶醇酯 Geranyl butyrate	Sigma	106-29-6	92	–	–
己酸乙酯 Ethyl caproate	TCI	123-66-0	>99	–	–
辛酸乙酯 Ethyl caprylate	TCI	106-32-1	98	–	–
丙酸丁酯 Butyl propionate	Sigma	590-01-2	>99	–	–
丁酸戊酯 Amyl butyrate	TCI	540-18-1	>96	–	–
苯乙酸甲酯 Methyl phenylacetate	Sigma	101-41-7	99	–	–
鳞翅目昆虫性信息素组分 Lepidopteran sex pheromone components*					
顺-9-十四碳烯醛(*Z*)-9-Tetradecenal	常州宁录生物有限公司	53939-27-8	>95	13.89 ±0.09	9.09
顺-11-十六碳烯-1-乙酸酯 (*Z*)-11-Hexadecen-1-yl acetate	常州宁录生物有限公司	34010-21-4	>90	–	–

续表 1 Table 1 continued

配体标样 Ligand samples	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.	纯度(%) Purity	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
顺 11-十四碳烯-1-醇乙酸酯 (*Z*)-11-Tetradecen-1-yl acetate	常州宁录生物有限公司	20711-10-8	>90	–	–
(*Z*9,*E*11)-十四碳烯-1-醇乙酸酯 (*Z*9,*E*11)-Tetradecen-1-yl acetate	常州宁录生物有限公司	合成	95%	–	–
顺-11-十六碳醛 *cis*-11-Hexadecenal *	TCI	53939-28-9	>90	18.05 ±0.05	11.67
低(不)挥发物 Low volatile or non-volatile compounds					
儿茶素(+)-Catechin hydrate	TCI	225937-10-0	>95	–	–
茶碱 Theophylline	北京百灵威科技有限公司	58-55-9	98	–	–
棉酚 Gossypol	Sigma	303-45-7	≥95	8.01 ±0.02	5.07
果糖 α-Fructofuranose	Sigma	57-48-7	>99	–	–
木糖 Aldehydo-d-xylose	北京百灵威科技有限公司	58-86-6	99	–	–
咖啡因 Caffeine	TCI	21399	>85	–	–
水杨苷 Salicin	TCI	138-52-3	>96	–	–
槲皮素 Quercetin	TCI	117-39-5	98	7.99 ±0.03	5.08
可可碱 Theobromine	北京百灵威科技有限公司	83-67-0	98	–	–
亚麻酸 Linolenic acid	TCI	60-33-3	>97	9.97 ±0.05	6.51
棕榈酸 Palmitic acid	TCI	57-10-3	>96	6.03 ±0.03	3.86

IC_{50}：配体置换 50% 探针 1-NPN 时的浓度 Concentration displacing 50% of the fluorescence intensity of the MmedOBP18/1-NPN complex；K_i：解离常数 Dissociation constant；–：未检测到 Not detected. * 根据 Zhu 等(1987)和万新龙等(2015)Based on Zhu *et al.* (1987) and Wan *et al.* (2015).

3　讨论

昆虫触角上的感器在识别化学信号的过程中发挥着重要作用。根据感器壁上是否有孔，将昆虫感器分为壁孔感器、顶孔感器和无孔感器。顶孔感器侧壁无孔，仅端部有 1 或 2 个孔，被认为参与昆虫味觉识别行为(汤清波等, 2011)。中红侧沟茧蜂触角上存在两种味觉感器——锥形感器 Ⅰ 和 Ⅲ，原位杂交结果显示 *MmedOBP*18 在雌蜂锥形感器 Ⅰ 中特异表达(Wang *et al.*, 2018)。本研究免疫组化结果也同样表明，气味结合蛋白 MmedOBP18 主要表达在寄生蜂触角上锥形感器 Ⅰ 下方淋巴液中，这与前期原位杂交的结果一致。昆虫气味结合蛋白除参与嗅觉识别外还在味觉感受行为中发挥功能。黑腹果蝇 *D. melanogaster* 气味结合蛋白 OBP57d 和 OBP57e 在足部的味觉感器表达(Yasukawa *et al.*, 2010)。烟草天蛾 *Manduca sexta* 气味结合蛋白 MadOBP10 在幼虫的味觉感器中表达(Campo *et al.*, 2011)。MmedOBP18 在中红侧沟茧蜂触角味觉感器中表达，可能与昆虫的味觉识别功能有关，可在寄主或寄主生境的近距离识别过程中发挥功能。

随后的荧光竞争结合实验显示，MmedOBP18 重组蛋白与非挥发性的植物次生物质槲皮素、棉酚、棕榈酸及亚麻酸等具有较强的结合能力，进一步证明 MmedOBP18 可参与中红侧沟茧蜂的味觉识别行为，这与上述其在触角感器中的表达特征具有一致性。气味结合蛋白参与昆虫味觉功能被越来越多的研究证实。气味结合蛋白 OBP11 在三点盲蝽 *Adelphocoris fasciaticollis* 和中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis* 口针锥形感器中高表达，可结合非挥发性植物次生物质槲皮素、棉酚、单宁酸等(魏宇, 2016)。中红侧沟茧蜂足上锥形感器中高表达的气味结合蛋白 MmedOBP19 可识别槲皮素、棉酚、芸香叶苷等，具有味觉识别功能(杨叶青等, 2017)。与 MmedOBP19 一样，气味结合蛋白 MmedOBP18 在中红侧沟茧蜂化学感受行为中可发挥味觉识别功能。

MmedOBP18 具有较广泛的结合谱，在供试的 83 种植物挥发物中，低挥发性的植物化合物与 MmedOBP18 有很强的结合力。其中具有中等结合力的 2-十一酮、癸醇、辛烷、癸醛被报道能够参与中红侧沟茧蜂的嗅觉识别过程，而且癸醛还是棉铃虫幼虫体表和生境的挥发物(Zhang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; 石庆型等, 2015)；而与 MmedOBP18 结合能力最强的 2-十三酮、十四酸、十一酸虽未见相关报道，但其低挥发性特点暗示可能在中红侧沟茧蜂

近距离嗅觉识别过程中发挥作用。有研究表明,小地老虎 *Agrotis ipsilon* AipsGOBP 可结合植物挥发物顺-3-己烯-1-醇和油酸,同时还可以识别其性信息素顺-7,12-碳乙酸酯和顺-9,14-碳乙酸酯(Huang *et al.*, 2018)。鳞翅目性信息素顺-9-十四碳烯醛及顺-11-十六碳醛(Zhu *et al.*, 1987; 万新龙等, 2015)与 MmedOBP18 也与有着较强的结合能力,表明该蛋白在中红侧沟茧蜂识别定位寄主昆虫过程中发挥作用。综上所述,我们推测 MmedOBP18 属于普通气味结合蛋白,在中红侧沟茧蜂触角化学感知过程中具有多重功能。接下来,我们将对 *MmedOBP*18 进行基因沉默,从电生理和行为学水平验证其蛋白在中红侧沟茧蜂化学感受行为中的信息识别功能。

参考文献(References)

Campo MLD, Palmer S, Caillaud M, 2011. Characterization of a new odorant binding protein gene in gustatory organs of *Manduca sexta* larvae (Lepidoptera: Sphingidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 104(2): 319-325.

Chen L, Li HL, Zhou YX, Zhao L, Zhang LY, Ni CX, Shang HW, 2013. cDNA cloning, tissue expression and ligand binding characteristics of odorant-binding protein 2 from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(6): 612-621. [陈玲, 李红亮, 周宇翔, 赵磊, 张林雅, 倪翠侠, 商晗武, 2013. 桔小实蝇气味结合蛋白 BdorOBP2 的 cDNA 克隆、组织表达及配基结合特性. 昆虫学报, 56(6): 612-621]

Cui HH, Gu SH, Zhu XQ, Wei Y, Liu HW, Khalid HD, Guo YY, Zhang YJ, 2016. Odorant-binding and chemosensory proteins identified in the antennal transcriptome of *Adelphocoris suturalis* Jakovlev. *Comp. Biochem. Physiol. Part D*, 24: 139-145.

Gu SH, Wang WX, Wang GR, Zhang XY, Guo YY, Zhang Z, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Functional characterization and immunolocalization of odorant binding protein 1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* Goeze. *Arch. Insect Biochem.*, 77(2): 81-99.

Huang GZ, Liu JT, Zhou JJ, Wang Q, Dong JZ, Zhang YJ, Li XC, Li J, Gu SH, 2018. Expressional and functional comparisons of two general odorant binding proteins in *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 98: 34-47.

Krieger J, Nickisch-Rosenegk EV, Mameli M, Pelosi P, Breer H, 1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 26(3): 297-307.

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373-391.

Li HL, Zhang LY, Zhuang SL, Ni CX, Han BY, Shang HW, 2013. Interpretation of odorant binding function and mode of general odorant binding protein ASP2 in Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*). *Sci. Agric. Sin.*, 46(1): 154-161. [李红亮, 张林雅, 庄树林, 倪翠侠, 韩宝瑜, 商晗武, 2013. 中华蜜蜂普通气味结合蛋白 ASP2 的气味结合功能模式分析. 中国农业科学, 46(1): 154-161]

Li KM, Wang SN, Zhang K, Ren LY, Ali A, Zhang YJ, Zhou JJ, Guo YY, 2014. Odorant binding characteristics of three recombinant odorant binding proteins in *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Chem. Ecol.*, 40(6): 541-548.

Li ZQ, He P, Zhang YN, Dong SL, 2017. Molecular and functional characterization of three odorant-binding protein from *Periplaneta americana*. *PLoS ONE*, 12(1): e0170072.

Ma M, Chang MM, Lei CL, Yang FL, 2016. A garlic substance disrupts odorant-binding protein recognition of insect pheromones released from adults of the angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Mol. Biol.*, 25(5): 530-540.

Pan HS, Zhao QJ, Zhao KJ, Zhang YJ, Wu KM, Guo YY, 2011. Responses of *Microplitis mediator* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) to different instar larvae of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) and damaged cotton plants. *Acta Entomol. Sin.*, 54(4): 437-442. [潘洪生, 赵秋剑, 赵奎军, 张永军, 吴孔明, 郭予元, 2011. 中红侧沟茧蜂对不同龄期棉铃虫幼虫及其为害棉株的趋性反应. 昆虫学报, 54(4): 437-442]

Pelosi P, Maida R, 1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 111(3): 503-514.

Pelosi P, 1999. Odorant-binding proteins: structural aspects. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 855(1): 281-293.

Peng Y, Wang SN, Li KM, Liu JT, Zheng Y, Shan S, Yang YQ, Li RJ, Zhang YJ, Guo YY, 2017. Identification of odorant binding proteins and chemosensory proteins in *Microplitis mediator* as well as functional characterization of chemosensory protein 3. *PLoS ONE*, 12(7): e0180775.

Robertson HM, Martos R, Sears CR, Todres EZ, Walden KK, Nardi JB, 1999. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol. Biol.*, 8(4): 501-518.

Shi QX, Luo QH, Zhao L, Zhou ZX, He GQ, Wei W, 2015. Extraction and identification of maize volatiles and cuticular volatiles of larval *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) related to host-habitat location and host location of parasitic wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(3): 244-255. [石庆型, 罗庆怀, 赵龙, 周正湘, 何广全, 韦卫, 2015. 与中红侧沟茧蜂生境与寄主定位相关的玉米及棉铃虫幼虫体表挥发性成分的提取与鉴定. 昆虫学报, 58(3): 244-255]

Song YQ, Xie XC, Dong JF, Wu JX, 2014. cDNA cloning, expression profiling and binding properties of odorant-binding protein GmolOBP3 in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptara: Tortricidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(3): 274-285. [宋月芹, 解幸承, 董钧锋, 仵均祥, 2014. 梨小食心虫气味结合蛋白 GmolOBP3 的 cDNA 克隆、表达谱及结合特性分析. 昆虫学报, 57(3): 274-285]

Swarup S, Morozova TV, Sridhar S, Nokes M, Anholt RRH, 2014. Modulation of feeding behavior by odorant-binding proteins in *Drosophila melanogaster*. *Chem. Senses*, 39: 125 – 132.

Tang QB, Ma Y, Huang LQ, Wang CZ, 2011. Advances in mechanisms of taste perception of insects. *Acta Entomol. Sin.*, 54(12): 1433 – 1444.［汤清波, 马英, 黄玲巧, 王琛柱, 2011. 昆虫味觉感受机制研究进展. 昆虫学报, 54(12): 1433 – 1444］

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161 – 163.

Vogt RG, Rybczynski R, Lerner MR, 1991. Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.*, 11(10): 2972 – 2984.

Wan XL, Li JH, Lao C, Du YJ, 2015. Antennal lobe neurons of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and their responses to plant odors and sex pheromones. *Acta Entomol. Sin.*, 58(3): 223 – 236.［万新龙, 李江辉, 劳冲, 杜永均, 2015. 斜纹夜蛾触角叶神经元及其对植物气味和性信息素的反应. 昆虫学报, 58(3): 223 – 236］

Wang SN, Shan S, Liu JT, Li RJ, Lu ZY, Dhiloo KH, Khashaveh A, Zhang YJ, 2018. Characterization of antennal chemosensilla and associated odorant binding as well as chemosensory proteins in the parasitoid wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Sci. Rep.*, 8(1): 7649.

Wei Y, 2016. Cloning and Functional Characterization of Homologous Odorant Binding Protein 11 of Two Mirids. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing.［魏宇, 2016. 两种盲蝽同源气味结合蛋白基因 OBP11 的克隆和功能研究. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文］

Wu J, Zhang HH, Yang YC, Chen S, Yang JQ, Wang B, Chen JH, 2018. Molecular cloning and binding characterization of the Minus-C odorant binding protein in *Bactrocera dorsalis*. *Acta Agric. Univ. Jiangxi.*, 40(2): 389 – 399.［吴健, 张贺贺, 杨燕川, 陈湜, 杨建全, 王波, 陈家骅, 2018. 一种桔小实蝇 Minus-C 气味结合蛋白的分子克隆和结合特征分析. 江西农业大学学报, 40(2): 389 – 399］

Xu WA, He JH, 2006. One new species of *Microplitis* Foerster (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae) from China. *Entomotaxonomia*, 28(3): 227 – 230.［许维岸, 何俊华, 2006. 侧沟茧蜂属一新种记述(膜翅目: 茧蜂科: 小腹茧蜂亚科). 昆虫分类学报, 28(3): 227 – 230］

Yan W, Liu L, Qin WQ, Luo YQ, Ma XZ, Haider N, Inayeh M, 2016. Identification and tissue expression profiling of odorant binding protein genes in the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *SpringerPlus*, 5(1): 1542.

Yang YQ, Wang SN, Peng Y, Shan S, Zheng Y, Li RJ, Zhang YJ, Guo YY, 2017. Expression of the odor binding protein MmedOBP19 in the legs of *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) and its ligand binding characteristics. *Acta Entomol. Sin.*, 60(6): 613 – 620.［杨叶青, 王山宁, 彭勇, 单双, 郑瑶, 李瑞军, 张永军, 郭予元, 2017. 气味结合蛋白 MmedOBP19 在中红侧沟茧蜂足部的表达及配体结合特征. 昆虫学报, 60(6): 613 – 620］

Yasukawa J, Tomioka S, Aigaki T, Matsuo T, 2010. Evolution of expression patterns of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e* in *Drosophila*. *Gene*, 467(1): 25 – 34.

Zhang K, Ren LY, Li KM, Wang M, Zhang YJ, Guo YY, 2011. Effect of volatile odors on taxis response of *Microplitis mediator* and its efficiency in field trapping test. *Chin. J. Biol. Control*, 27(2): 157 – 164.［张康, 任丽燕, 李科明, 王沫, 张永军, 郭予元, 2011. 植物挥发性气味物质对中红侧沟茧蜂的趋向行为影响及田间诱集效果. 中国生物防治学报, 27(2): 157 – 164］

Zhang S, Chen LZ, Gu SH, Cui JJ, Gao XW, Zhang YJ, Guo YY, 2011. Binding characterization of recombinant odorant-binding proteins from the parasitic wasp, *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Chem. Ecol.*, 37(2): 189 – 194.

Zhu PC, Kong FL, Yu YQ, 1987. Sex pheromone of oriental armyworm *Mythimna separata* Walker. *J. Chen. Ecol.*, 13(5): 977 – 991.

(责任编辑: 马丽萍)